

مقاله آموزشی

اساس مولکولی اختلالات پراکسی زوم ها در نشانگان زلویگر

کامران قائدی^{۱*}، صادق ولیان بروجنی^۱، یوسف شفقتی^۳، ایثار نصیری^۱ثریا قاسمی^۱

۱- بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان ۲- گروه سلول های بنیادی، پژوهشکده رویان پایگاه تحقیقاتی اصفهان
 ۳- مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توان بخشی تهران

چکیده

پراکسی زوم ها اندامک هایی هستند که در همه سلول های یوکاریوتی، از مخمر تا انسان، حضور دارند. تقریباً ۵۰ واکنش مختلف بیوشیمیایی، شامل ساخت اسیدهای صفراوی، کلسترول، فسفولیپیدهای اتری (پلاسمالوژن ها)، اسید دکوزاهگزا-انوییک و سوخت و ساز برخی اسیدهای چرب، به ویژه اسیدهای چرب بسیار بلند زنجیر (VLCFAs) در پراکسی زوم انجام می شود. پروتئین هایی که در عملکرد پراکسی زوم نقش دارند پروکسین نام دارند. حداقل ۲۹ پروکسین جهت ورود پروتئین ها، تشکیل و تقسیم غشاء پراکسی زوم ضروری هستند. تاکنون جهش در ۱۳ ژن رمز کننده پروکسین ها مرتبط با بیماری های انسانی شناسایی شده است. در حال حاضر بیماری های پراکسی زومی در سه گروه قرار می گیرند: اختلالات تشکیل پراکسی زوم (PBDs)، اختلالات چندآنزیمی پراکسی زوم و اختلالات تک آنزیمی پراکسی زوم. بیماری رفسام دوران کودکی (IRD)، آدرنولکودیستروپی دوران نوزادی (NALD) و نشانگان زلویگر (ZS) انواع مختلفی از اختلالات مادرزادی هستند که به عنوان بیماری های تشکیل پراکسی زوم شناخته می شوند. مشخصه این بیماری ها فقدان پراکسی زوم های طبیعی در سلول های بدن است. اغلب این اختلالات کشنده هستند. ما در این مقاله وقایع مولکولی ایجاد کننده این اختلالات را توصیف و روش های مولکولی رایج تشخیص این اختلالات، مانند بررسی جهش ها و تعیین مشخصات فیبروبلاست های به دست آمده از بیماران را معرفی می کنیم. واژه های کلیدی: آدرنولکودیستروپی؛ بیماری رفسام؛ نشانگان زلویگر؛ پروکسین؛ اختلالات تشکیل پراکسی زوم

مقدمه

میلینی افزایش می یابد (۱). در سال ۱۹۶۴ دو گروه مجزا از محققان بیماری جدیدی را در نوزادانی در شهرهای ایووا^۳ و ماریلند^۴ در امریکا گزارش کردند. دکتر هانس زلویگر^۵ برای نخستین بار این بیماری را در شهر ایووا توصیف کرد. سپس اُپتیز^۶ با مقایسه گزارش ها به این نتیجه رسید که هر دو این گزارش ها مربوط به یک نوع بیماری هستند و آن را نشانگان مغزی-کبدی-کلیوی زلویگر^۷ نامید که امروزه اغلب نشانگان زلویگر نامیده می شود.

نشانگان زلویگر (ZS)^۱ یک بیماری ارثی است که علائم بالینی آن در بدو تولد تظاهر می یابد و معمولاً در شش تا دوازده ماهگی به مرگ منجر می شود. این نشانگان به علت فقدان یا کاهش تعداد پراکسی زوم ها بروز می کند و به گروهی از بیماری های ژنتیکی با نام لکودیستروپی^۲ تعلق دارد. در لکودیستروپی هایمیزان چربی پوشاننده تارهای عصبی (پوشش

*کامران قائدی، PhD

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک / ۰۳۱۱-۷۹۳۳۴۷۹/

Email: kamranghaedi@yahoo.co / تلفن: ۲۲۴۰۷۸۱۴

1-Zellweger Syndrome 2-Leukodystrophy
 3-Iowa 4-Maryland.
 5-Hans Zellweger 6-Opitz 7-Cerebro-hepato-renal Syndrome

جدول ۱: مشخصات ۱۲ ژن پروکسین مرتبط با نشانگان زلویگر (۶)

ژن	تعداد اگزون ها	طول DNA ژنومی (kb)	cDNA (kb)	تعداد آمینواسیدها	نام و عملکرد پروتئین
<i>PEX1</i>	۲۴	۴۱/۵	۳/۹	۱۲۸۳	PBF 1
<i>PXMP3(PEX2)</i>	۴	۷/۴	۱/۵	۶۲۶	PAF 1
<i>PEX3</i>	۱۲	۳۹	۱/۱	۳۷۳	PBF 3
<i>PEX5</i>	۱۵	۲۸/۹	۱/۸	۶۳۹	PTS 1 receptor
<i>PEX6</i>	۱۷	۱۵/۱	۳/۴	۹۸۰	PXMP PEX16
<i>PEX10</i>	۶	۷/۸	۱	۳۳۵	PAF 10
<i>PEX12</i>	۳	۳/۸	۱/۱	۳۵۶	PAF 12
<i>PEX13</i>	۴	۳۱/۲	۱/۲	۴۰۳	PXMP PEX13
<i>PEX14</i>	۹	۱۳۵/۵	۱/۱	۳۷۷	PXMP PEX14
<i>PEX16</i>	۱۱	۸/۴	۱	۳۴۶	PXMP PEX16
<i>PEX19</i>	۸	۵/۷	۰/۹	۲۹۹	PBF 19
<i>PEX26</i>	۵	۱۰/۷	۰/۹	۳۰۵	PAF 26

PBF: Peroxisome biogenesis factor; PAF: Peroxisome assembly factor; PXMP: Peroxisomal membrane protein; PTS: Proxisomal targeting signal

ریزوملیک (RCDP)^{۱۲} است که تظاهر بالینی تری نسبت به نشانگان زلویگر نشان می‌دهند (۴).

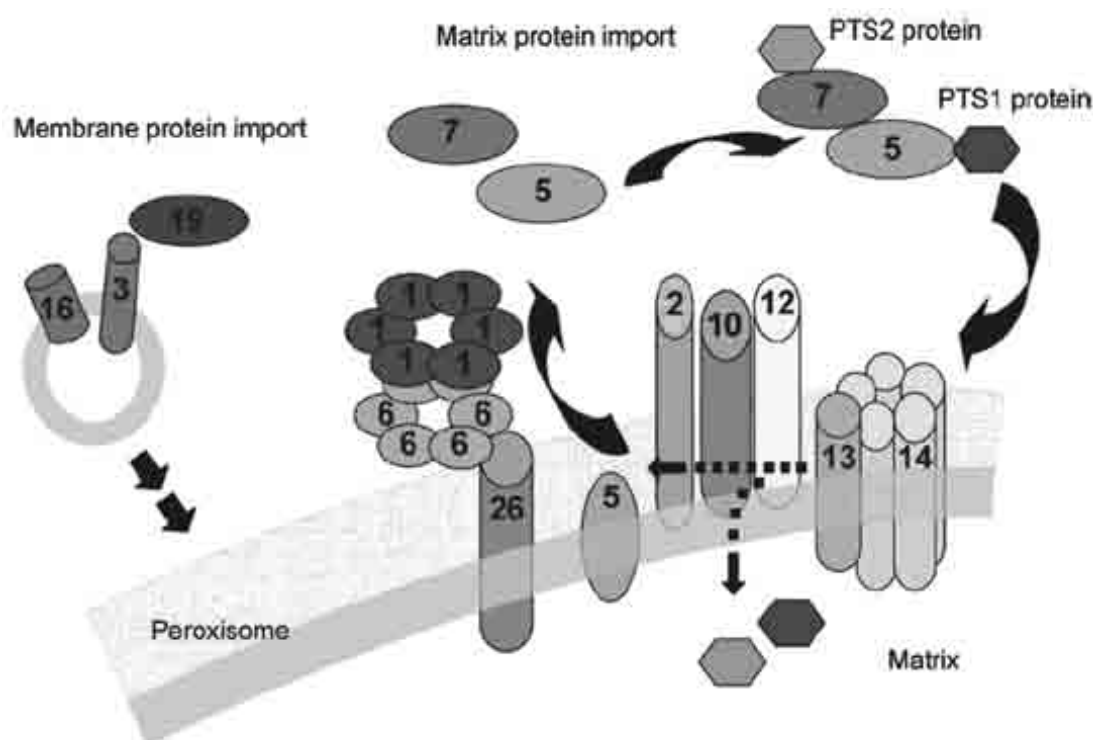
تشکیل پراکسی زوم ها در سلول

حداقل ۲۹ نوع مختلف از پروکسین‌ها^{۱۳} در تشکیل و ادغام غشاء پراکسی زوم ها و انتقال پروتئین ها به داخل این اندامک ها نقش دارند جهت مشخص کردن ژن های کدکننده این پروتئین ها از اختصار PEX و اعدادی که به دنبال آن می آید، استفاده می شود (۵). تاکنون ارتباط جهش در ۱۳ ژن کدکننده پروکسین ها در انسان با نشانگان زلویگر مشخص شده است (۶) (جدول ۱). اگرچه سازوکار تشکیل غشاء در پراکسی زوم ها به خوبی شناخته نشده است، اما جهش هایی در ژن های *PEX3*، *PEX16* و *PEX19* مانع از تشکیل هرگونه غشاء پراکسی زومی می شود که با رنگ آمیزی پروتئین های غشایی مانند ALDP و PMP70 با آنتی بادی شناسایی می شوند. پروکسین های دیگر در انتقال پروتئین های ماتریکس پراکسی زومی به داخل این اندامک نقش دارند و جهش در آنها موجب تشکیل پراکسی زوم هایی با اندازه بزرگتر و تعداد کمتر می شود (۷). به طور کلی پروتئین های ماتریکس پراکسی زوم به وسیله ژن های هسته ای رمزگذاری و بر روی پلی ریبوزوم های آزاد سیتوپلاسمی ترجمه می شوند. پروتئین های پراکسی زومی دارای توالی های مورد توافق در انتهای کربوکسیل خود

در سال ۱۹۷۳ محققان گزارش دادند که سلول های کبدی و کلیوی افراد مبتلا به نشانگان زلویگر فاقد پراکسی زوم هستند از آنجایی که واکنش های شیمیایی مهمی در پراکسی زوم انجام می گیرد، این بیماری جزء بیماری های متابولیک دسته بندی شده است (۲). پراکسی زوم اندامک کوچکی است که در همه سلول ها، به ویژه کبد، کلیه و مغز یافت می شود و مولکول های بسیاری چون اسیدهای چرب بلند زنجیر، اسیدهای چرب غیراشباع، پروستاگلاندین ها و کلسترول های شاخه دار در آن تجزیه می شوند. اگر نقصی در عملکرد یا تعداد پراکسی زوم ها رخ دهد میزان این مولکول ها در سلول افزایش می یابد (۳). هم چنین مراحل اولیه ساخت پلاسمالوژن ها^۸ که از اجزاء مهم تشکیل دهنده پوشش چربی تارهای عصبی هستند، در پراکسی زوم انجام می گیرد. این پوشش به تارهای عصبی کمک می کند تا پیام های عصبی را به درستی و بدون تداخل با تارهای مجاور منتقل کنند. بنابراین، وجود پراکسی زوم جهت ساخت پلاسمالوژن ها و عملکرد صحیح بافت های عصبی ضروری است. این اندامک هم چنین در ساخت اسیدهای صفراوی نقش دارد. اسیدهای صفراوی هنگام وارد شدن چربی ها به روده کوچک آزاد می شوند و به تجزیه اولیه آنها کمک می کنند.

کودکان مبتلا به نشانگان زلویگر دارای تأخیر در تکامل حرکتی، نقص در سیستم عصبی، شلی^۹، بزرگی کبد، کیست های کلیه و اغلب ناشنوایی یا نابینایی هستند. زردی شدید نیز در هنگام تولد شایع است (۴). انواع دیگر لکودیستروپی ها شامل آدرنولکودیستروپی دوران نوزادی (NALD)^{۱۰}، بیماری رفسم دوران کودکی^{۱۱} و کندرودیسپلازی پانکتاتای

8-Plasmalogens	9-Hypotonia
10-Neonatal Adrenoleukodystrophy	11-Infantile Refsum Disease
12-Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata	13-Peroxin



شکل ۱: طرح کلی ورود پروتئین غشایی و پروتئین زمینه به پراکسی زوم. اعداد نشانگر پروکسین ها هستند (اقتباس از منبع ۶).
 PTS: Peroxisomal targeting signal

هستند که توالی هدف پراکسی زومی (PTS)^{۱۴} نامیده می شود. جهش در برخی از ژن های *PEX* در ترابری PTS1 و PTS2 تأثیر می گذارد و ممکن است موجب توقف کامل انتقال (در افراد مبتلا به نشانگان زلوگر) و یا کاهش آن (در موارد خفیف تر بیماری) شود. ژن *PXR1* یا *PEX5* کدکننده گیرنده پروتئین های حاوی توالی هدف پراکسی زومی نوع ۱ (PTS1) و ژن *PEX7* کدکننده گیرنده پروتئین های حاوی توالی هدف پراکسی زومی نوع ۲ (PTS2) است (شکل ۱). جهش های *PEX7* موجب بروز نوع ویژه ای از لکودیستروفی به نام کندرو دیسپلازی پانکتاتای ریزوملیک (RCDP) می شود (۸). دو اجتماع پروتئینی در غشاء پراکسی زوم ها وجود دارد که اولی شامل پروکسین های *Pex13p*، *Pex14p* و *Pex17p* و دومی شامل *Pex2p*، *Pex10p* و *Pex12p* است. اولین اجتماع پروتئینی در به دام انداختن پروتئین های حاوی PTS1 و PTS2 متصل به گیرنده های مربوط به خود نقش دارد و دومین اجتماع پروتئینی بخشی از ساختار انتقال دهنده پروتئین ها از سیتوپلاسم به ماتریکس پراکسی زومی را تشکیل می دهد. *Pex6p* و *Pex1p* اجتماع پروتئینی را می سازند که در چرخه مجدد^{۱۵} گیرنده های رمزگذاری شده توسط *Pex5p* و

Pex26p پروتئینی است که اخیراً شناسایی شده است و مستقیماً به اجتماع پروتئینی *Pex1p*-*Pex6p* متصل می شود. همان گونه که مشاهده می شود، هر سه پروتئین نقشی ضروری در انتقال PTS1 و PTS2 به غشاء پراکسی زومی برعهده دارند (۹). در سلول های سالم، تکامل پراکسی زوم ها از دستگاه گلژی به وسیله پروکسین های *PEX3*، *PEX16* و *PEX19* آغاز می شود. جهت ورود پروتئین های غشایی به پراکسی زوم های در حال رشد احتمالاً تنها به *PEX19* به منظور شناسایی و اتصال به *PEX3* نیاز است. پروتئین های زمینه ای در سیتوپلاسم به وسیله توالی نشانه خود شناسایی و به مجموعه *PEX13* و *PEX14* در غشاء پراکسی زوم متصل می شوند. به نظر می رسد که *PEX5* در داخل غشاء پراکسی زوم قرار دارد. پروتئین زمینه ای متصل به مجموعه یاد شده توسط فرآیند ناشناخته ای، از میان مجموعه انگشتی شکل *PEX2*، *PEX10* و *PEX12* وارد زمینه می شود. *PEX5* به کمک مجموعه پروتئینی *PEX1* و *PEX6* و پروتئین غشایی *PEX26* از غشاء خارج و برای چرخه بعدی وارد سازی آماده می شود (۶) (شکل ۱).

14-Peroxisomal Targeting Sequence 15-Recycling 16-Ghost

ژنتیک مولکولی نشانگان زلویگر

نشانگان زلویگر وراثت اتوزومی مغلوب دارد. این بدان معنا است که جهت بروز بیماری، فرد باید آلل بیماری را از هم از پدر و هم از مادر خود به ارث ببرد. افرادی که یک آلل از ژن بیماری را به ارث می‌برند، ناقل نامیده می‌شوند و هیچ‌گونه علائمی از بیماری در آنها مشاهده نمی‌شود. در مواردی که پدر یا مادر ناقل هستند، به احتمال ۲۵٪ فرزند آنها بیمار، ۵۰٪ ناقل و ۲۵٪ سالم خواهد بود.

علت بروز نشانگان زلویگر عدم توانایی پراکسی زوم ها در وارد کردن پروتئین‌های پراکسی زومی جدید ساخته شده به داخل فضای درون غشایی است. در این حالت غشاء پراکسی زوم تشکیل شده، اما خالی از هرگونه پروتئین است و به آن اشباح پراکسی زومی^{۱۶} گفته می‌شود. این پروتئین‌ها در بیرون پراکسی زوم ها باقی می‌مانند و تجزیه می‌شوند. همان‌طور که اشاره شد، جهش در چندین ژن مختلف تولیدکننده پروکسین‌ها موجب بروز نشانگان زلویگر می‌شود. در این مقاله جهش‌های ۵ نمونه از مهم‌ترین ژن‌های *PEX* که موجب بروز بیش از ۹۰ درصد موارد ابتلا به نشانگان زلویگر می‌شوند، معرفی می‌شود.

ژن *PEX1*

۲۵ آلل مختلف برای این ژن شناسایی شده است. آلل‌های حاوی جهش‌های *G843D* و *I700fs* بیشترین فراوانی را دارند (۶۳٪). این فراوانی احتمالاً به علت وجود یک نیای مشترک در بیماران است. احتمال وقوع جهش مجدد در این نقاط پایین است و به عنوان نقطه داغ جهش شناخته نمی‌شوند (۱۰ و ۱۱). اخیراً در ناحیه پروموتور ژن *PEX1* دو تغییر نوکلئوتیدی *C-137T* و *C-53C>G* شناسایی شده که اولی موجب افزایش بیان و دومی موجب کاهش بیان آن می‌شود و هنگامی که این دو با هم وجود داشته باشند، اثر یکدیگر را خنثی می‌کنند (۱۱).

ژن *PEX6*

برای این ژن آلل رایجی شناخته نشده است و اکثر جهش‌های آن از نوع تغییر چهارچوب^{۱۷} و بدمعنی^{۱۸} هستند (۱۲).

ژن *PEX10*

اکثر جهش‌های گزارش شده در این ژن از نوع تغییر چهارچوب و بدمعنی هستند شایع‌ترین آلل این ژن نیز *Nt814-15delCT (L271fs)* است (۱۳).

ژن *PEX12*

جهش‌های این ژن از نوع تغییر چهارچوب، بدمعنی و اختلال در پردازش^{۱۹} هستد

در این میان، جهش‌های تغییر چهارچوب و بدمعنی موجب تظاهر فنوتیپی شدیدتری می‌شوند (۱۴).

ژن *PEX26*

PEX26 پروکسینی است که اخیراً شناسایی شده است. اکثر جهش‌های ژن *PEX26* در اگزون‌های ۲ و ۳ اتفاق می‌افتد که از آن جمله می‌توان به *G89R* و *R98W* اشاره کرد. بیماران هتروزیگوت مرکب شامل جهش‌های *M1T/L45P* و *R98W/L85fs* نیز مشاهده شده‌اند (۱۵ و ۱۶).

جهش در دو ژن *PEX1* و *PEX6* با تظاهر بالینی کامل بیماری همراه است. در مقابل، در تظاهرات بالینی افراد دارای جهش در *PEX10*، *PEX12*، و *PEX26* تنوعاتی دیده می‌شود. جهش‌های *PEX3*، *PEX16* و *PEX19* موجب بروز شدیدترین فنوتیپ نشانگان زلویگر می‌شوند. نقص در این سه ژن موجب بروز فنوتیپ‌های سلولی می‌شود که به وسیله بررسی ایمونوهیستوکیماشناسایی می‌شوند. در رده سلولی این افراد هیچ نوع غشاء پراکسی زومی تشکیل نمی‌شود. به‌طور کلی، ارتباط مستقیمی بین فنوتیپ‌های بیوشیمیایی و نقص در ژن *PEX* وجود ندارد. از این رو شناسایی یک جهش در ژن‌ها بر اساس فنوتیپ‌های بیوشیمیایی میسر نیست.

تشخیص بالینی

تشخیص نشانگان زلویگر بر اساس تظاهرات بالینی و آزمایش‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی جهت بررسی عملکرد و ساختار پراکسی زوم‌ها انجام می‌گیرد. اختلالات بیوشیمیایی شامل افزایش سطح اسیدهای چرب بلند زنجیر، کاهش در سطح آنزیم پراکسی زومی دی‌هیدروکسی استون فسفات آسیل ترانسفراز (DHAPAT)^{۲۰}، حضور غیرطبیعی واسطه‌های ساخت اسیدهای صفراوی، و فقدان پلاسمالوژن در نمونه‌های خون است. بررسی فقدان پراکسی زوم‌ها در نمونه بافت کبد نیز جهت تشخیص نشانگان زلویگر ضروری است (۱۷ و ۱۸).

اختلالات بیوشیمیایی که در خون و یا ادرار شناسایی شده‌اند باید با کشت فیبروبلاست‌ها تأیید شوند. یکی از آزمایش‌های تشخیصی اولیه و بسیار متداول، اندازه‌گیری سطح اسیدهای چرب بسیار بلند زنجیر (VLCFA) در پلاسما است. اختلالات متابولیسم اسیدهای چرب در پراکسی زوم‌ها با افزایش سطح *C26:0* و *C26:1* و نسبت *C24/C22* و *C26/C22* همراه است (۱۷ و ۱۸).

تشخیص پیش از تولد با اندازه‌گیری سطح پلاسمالوژن و اسیدهای چرب

17-Frameshift
19-Splicing
20-Dihydroxyacetone Phosphate Acyl Transferase

18-Missense

جدول ۲: آزمایش‌های ژنتیک مولکولی جهت تشخیص نشانگان زلویگر (۱۰ و ۱۱)

روش تشخیص	شناسایی جهش‌ها	فرآوانی جهش‌های شناسایی شده
بررسی توالی اگزون‌های منتخب	در توالی اگزون ۱۳ (محل قرارگیری 1700fs) و اگزون ۱۵ (محل قرارگیری G843D) <i>PEX1</i>	%۵۰
	<i>PEX1, PXMP3 (PEX2), PEX10, PEX12, PEX26</i>	%۵۰
بررسی توالی تمام اگزون‌های کدکننده پروتئین	<i>PEX1, PXMP3 (PEX2), PEX6, PEX10, PEX12, PEX5</i>	%۵۰

شده است و نیاز به مطالعات تکمیلی و کشت فیبروبلاست‌های بیماران مبتلا به این بیماری را برطرف می‌کند: بررسی توالی اگزون‌های ۱۳، ۱۵ و ۱۸ ژن *PEX1*، اگزون ۴ ژن *PEX2*، اگزون ۱ ژن *PEX6*، اگزون‌های ۳ تا ۵ ژن *PEX10*، اگزون‌های ۲ و ۳ ژن *PEX12*، و اگزون‌های ۲ و ۳ ژن *PEX26*، با حساسیت ۷۹٪ یکی از این روش‌هاست. روش دیگر شامل بررسی توالی اگزون‌های ۱۳ و ۱۵ ژن *PEX1*، اگزون ۴ ژن *PEX2*، اگزون ۴ و ۵ ژن *PEX10*، اگزون ۲ و ۳ ژن *PEX12*، و اگزون ۲ و ۳ ژن *PEX26* با حساسیت ۷۲٪ است (۲۰).

بلند زنجیر در کشت سلول‌های به دست آمده از نمونه برداری پرزهای جفتی (CVS) یا آمنیوسنتز انجام می‌گیرد (۱۹). کاربرد آزمایش‌های ژنتیک مولکولی در شناسایی ناقلان، تشخیص پیش از تولد و شناسایی دقیق بیماری در موارد مشاهده فنوتیپ مشکوک لازم است. روش بالینی جهت آزمایش ژنتیک مولکولی شامل بررسی اگزون‌های انتخاب شده *PEX1* و الگوریتم ژنی *PEX* است. ۵۰٪ افراد مبتلا به PBD دارای جهش‌هایی در توالی اگزون ۱۳ (محل قرارگیری 1700fs) و اگزون ۱۵ (محل قرارگیری G843D) ژن *PEX1* هستند که با بررسی توالی ژنی شناسایی می‌شوند (۱۵) (جدول ۲). دو الگوریتم نسبتاً متفاوت جهت بررسی اگزون‌های دیگر *PEX* طراحی

References

- Gould SJ, Raymond GV, Valle D. The peroxisome biogenesis disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8 ed. McGraw-Hill, 2001; pp3181-218.
- Wiedemann HR. Hans-Ulrich Zellweger (1909-1990). Eur J Pediatr 1991; 150: 451.
- Poll-The BT, Gootjes J, Duran M, De Klerk JB, Wenniger-Prick LJ, Admiraal RJ, et al. Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients. Am J Med Genet A 2004; 126: 333-8.
- Shimozawa N, Tsukamoto T, Nagase T, Takemoto Y, Koyama N, Suzuki Y, et al. Identification of a new complementation group of the peroxisome biogenesis disorders and PEX14 as the mutated gene. Hum Mutat 2004; 23: 552-8.
- Lyons CJ, Castano G, McCormick AQ, Applegarth D. Leopard spot retinal pigmentation in infancy indicating a peroxisomal disorder. Br J Ophthalmol 2004; 88: 191-2.
- Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV, Braverman NE, Moser AV, Moser HW. Peroxisome biogenesis disorders. Biochim Biophys Acta 2006; 1763: 1733-48.
- Ghaedi K, Honsho M, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y. PEX3 is the causal gene responsible for peroxisome membrane assembly-defective Zellweger syndrome of complementation group G. Am J Hum Genet 2000; 67: 976-81.
- Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwachter H, Rehling P, Sickmann A, et al. Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxysomal import machinery. Mol Cell 2003; 11: 635-46.
- Collins CS, Kalish JE, Morrell JC, McCaffery JM, Gould

- SJ. The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p, and pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7516-26.
10. Steinberg S, Chen L, Wei L, Moser A, Moser H, Cutting G, et al. The PEX Gene Screen: molecular diagnosis of peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger syndrome spectrum. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 252-63.
11. Maxwell MA, Leane PB, Paton BC, Crane DI. Novel PEX1 coding mutations and 5' UTR regulatory polymorphisms. *Hum Mutat* 2005; 26: 279.
12. Zhang Z, Suzuki Y, Shimozawa N, Fukuda S, Imamura A, Tsukamoto T, et al. Genomic structure and identification of 11 novel mutations of the PEX6 (peroxisome assembly factor-2) gene in patients with peroxisome biogenesis disorders. *Hum Mutat* 1999; 13: 487-96.
13. Shimozawa N, Nagase T, Takemoto Y, Ohura T, Suzuki Y, Kondo N. Genetic heterogeneity of peroxisome biogenesis disorders among Japanese patients: evidence for a founder haplotype for the most common PEX10 gene mutation. *Am J Med Genet* 2003; 120: 40-3.
14. Chang CC, Gould SJ. Phenotype-genotype relationships in complementation group 3 of the peroxisome-biogenesis disorders. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1294-306.
15. Steinberg S, Chen L, Wei L, Moser A, Moser H, Cutting G, et al. The PEX Gene Screen: molecular diagnosis of peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger syndrome spectrum. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 252-63.
16. Weller S, Cajigas I, Morrell J, Obie C, Steel G, Gould SJ, et al. Alternative splicing suggests extended function of PEX26 in peroxisome biogenesis. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 987-1007.
17. Plecko B, Stockler-Ipsiroglu S, Paschke E, Erwa W, Struys EA, Jakobs C. Pipecolic acid elevation in plasma and cerebrospinal fluid of two patients with pyridoxine-dependent epilepsy. *Ann Neurol* 2000; 48: 121-5.
18. Baas JC, van de Laar R, Dorland L, Duran M, Berger R, Poll-The BT, et al. Plasma pipecolic acid is frequently elevated in non-peroxisomal disease. *J Inher Metab Dis* 2002; 25: 699-701.
19. Johnson JM, Babul-Hirji R, Chitayat D. First-trimester increased nuchal translucency and fetal hypokinesia associated with Zellweger syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 17: 344-6.
20. Michelakakis HM, Zafeiriou DI, Moraitou MS, Gootjes J, Wanders RJ. PEX1 deficiency presenting as Leber congenital amaurosis. *Pediatr Neurol* 2004; 31: 146-9.